

NO を測定したい

使用製品

- ・ NO₂/NO₃ Assay Kit-C II(Colorimetric) ~ Griess Reagent Kit ~ [NK05]
- ・ NO₂/NO₃ Assay Kit-FX(Fluorometric) ~ 2,3-Diaminonaphthalene Kit ~ [NK08]

解析装置

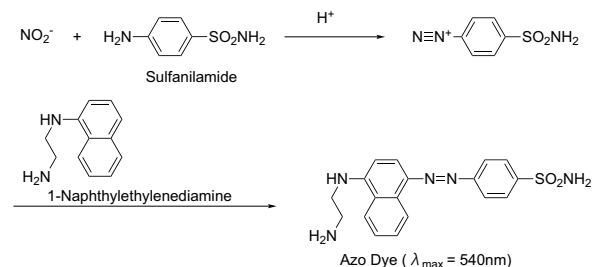


I. 比色法にて測定する場合

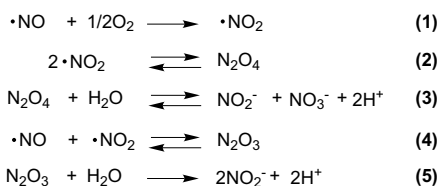
1. はじめに

最近、一酸化窒素(NO)が情報伝達物質として多くの生理的現象に関与していることが明らかとなり、NOに関する研究が盛んに行われている。これまで開発されたNOの測定法には、NOをオゾン酸化したときに発生する発光を利用する化学発光法、オキシヘモグロビン(O₂Hb)が酸化されて生じるmetHbの吸収スペクトルを測定する方法、電極を組織に差し込み酸化されるときに流れる電流で定量する方法、およびGriess法などがある。

この章では小社 NO₂/NO₃ Assay Kit - C II (Colorimetric) ~ Griess Reagent Kit~(Code: NK05) を用いた方法について記載する。Griess法はNOの簡便な測定法としてよく用いられている。Griess法はNOが酸化されて生じるNO₂⁻によるジアゾニウム塩化合物とナフチルエチレンジアミンのアゾカップリングを利用して検出する方法(下図)であるため、NOを直接測定するものではなくNOが変化したNO₂⁻を測定するという間接的な方法ではあるが、特別な装置や技術を必要としないという利点がある。



しかしながら、Griess法はNO₂⁻としか反応できないのに対し、NOは水中で以下のように加水分解され最終的にNO₂⁻とNO₃⁻になる。



本キットは還元酵素を含んでおり、[NO₂⁻]と[NO₃⁻]の両方が測定できる。10~100 μmol/l の濃度領域に適している。

2. キット内容

- ・ NaNO₂ 標準溶液 (100 μmol/l) × 1
- ・ NaNO₃ 標準溶液 (100 μmol/l) × 1
- ・ 緩衝溶液 (20 mmol/l, pH7.6) × 1
- ・ 還元酵素 (緩衝溶液 1.2 ml に溶かして使用する) × 1
- ・ 補酵素 (緩衝溶液 1.2 ml に溶かして使用する) × 1
- ・ 試薬 A × 1
- ・ 試薬 B × 1

3. [NO₂⁻] 検量線の作成

1) 96穴マイクロプレートに次のようにNaNO₂標準溶液を調製する。

well	NaNO ₂ 標準溶液 (μl)	緩衝溶液 (μl)	NO ₂ 濃度 (μmol/l)
A1	0	80	0
B1	20	60	25
C1	40	40	50
D1	80	0	100

- ※ 検量線作成のためのスポット数は、必要に応じて追加する。
- 2) 各ウェルに緩衝溶液 20 μl を加え全量を 100 μl とする。
 - 3) 試薬 A 50 μl を加えよく混和し 5 分間放置する。試薬 B 50 μl を加え混和し、室温で 10 分間反応後マイクロプレートリーダーで 540 nm の吸光度を測定する。(540 nm のフィルターがない場合は 530~580 nm の最も適当なフィルターを用いて測定する)
 - 4) 得られた値とブランク値(A1の値)との差を求める。
 - 5) 横軸にNaNO₂の濃度、縦軸に吸光度をとり、この結果をプロットする。

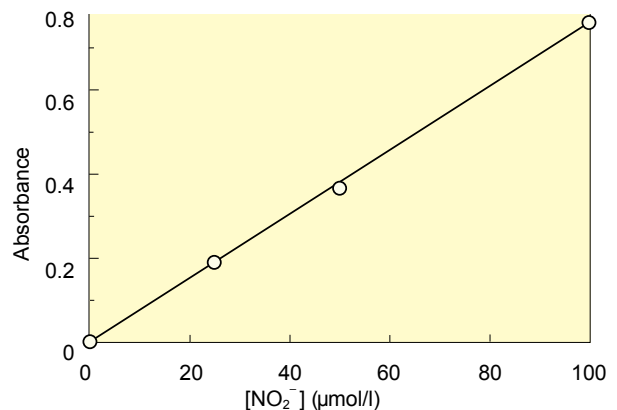


図1 NaNO₂ の検量線の例

4. [NO₂⁻ + NO₃⁻] 検量線の作成

1) 96穴マイクロプレートに次のようにNaNO₃標準溶液を調製する。

well	NaNO ₃ 標準溶液 (μl)	緩衝溶液 (μl)	NO ₃ 濃度 (μmol/l)
E1	0	80	0
F1	20	60	25
G1	40	40	50
H1	80	0	100

- ※ 検量線作成のためのスポット数は、必要に応じて追加する。
- 2) 各ウェルに補酵素溶液 10 μl、酵素溶液 10 μl を入れ、よく混和する。
 - 3) そのまま室温(約25°C)にて 2 時間インキュベートする。
 - 4) 試薬 A 50 μl を加えよく混和して 5 分間反応する。試薬 B 50 μl を加え混和し、10 分間反応後、マイクロプレートリーダーで 540 nm の吸光度を測定する。(540 nm のフィルターがない場合は、530 ~ 580 nm の最も適当なフィルターを用いて測定する)
 - 5) 得られた値とブランク値(E1の値)との差を求める。
 - 6) 横軸にNaNO₃の濃度、縦軸に吸光度をとり、この結果をプロットする。

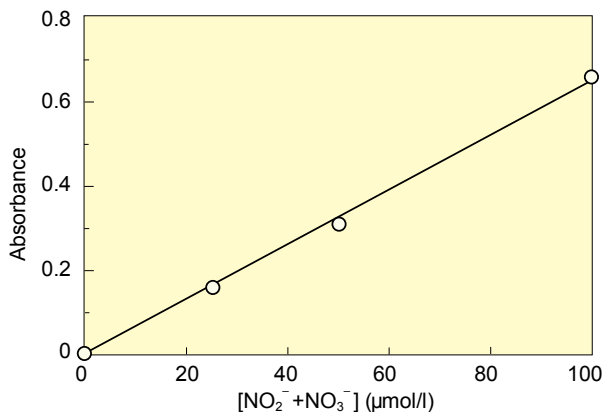


図 2 NaNO₂ + NaNO₃ の検量線の例

5. サンプルの調製法

培養液あるいは血清などを試料として測定に用いる場合、以下の点に注意して調製すること。

- MEM あるいは DMEM などの細胞培養液を測定に用いる場合、まず 1,000 x g (15 min, RT) で遠心分離し、その上澄みをとる (血清を添加している場合は除タンパクを行うこと)。
- 血清を測定に用いる場合、Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Unit with Ultracel-10 membrane([UFC801008], Millipore 社) などで除タンパク (例えば 7,000 x g, 4°C, 20 min) を行う。
- 硝酸イオンを多く含む培養液 (RPMI1640 など) は [NO₂⁻ + NO₃⁻] の測定はできないが、[NO₂⁻] のみについては測定可能である。

6. 未知試料の [NO₂⁻] 測定

- 96穴マイクロプレートの A2~H12 の空いているウェルに各ウェルあたり 80 μl のサンプルを入れる。
- 緩衝溶液 20 μl を加え全量を 100 μl とする。
- 試薬 A 50 μl を加えよく混和し 5 分間反応する。試薬 B 50 μl を加え混和し、10 分間反応させた後マイクロプレートリーダーで測定する。
- 得られた値とブランク値 (A1) との差を求める。
3. で求めた検量線より [NO₂⁻] 濃度を求める。

7. 未知試料の [NO₂⁻ + NO₃⁻] 測定

- 96穴マイクロプレートの A2~H12 の空いているウェルに各ウェルあたり 80 μl のサンプルを入れる。
- 補酵素溶液 10 μl、酵素溶液 10 μl を入れ、よく混和する。
- そのまま室温(約25°C)にて 2 時間インキュベートする。
- 試薬 A 50 μl を加えよく混和し、5 分間反応置する。試薬 B 50 μl を加え混和し、10 分間反応させた後マイクロプレートリーダーで測定する。
- 得られた値とブランク値 (E1) との差を求める。
4. で求めた検量線より [NO₂⁻ + NO₃⁻] 濃度を求める。

8. 未知試料の [NO₃⁻] 測定

未知試料の [NO₃⁻] 濃度は 6. で得られた [NO₂⁻] と 7. で得られた [NO₂⁻ + NO₃⁻] より求められる。
 $[NO_3^-] = [NO_2^- + NO_3^-] - [NO_2^-]$

9. 使用上の注意

- 酵素溶液、補酵素溶液は氷浴上で使用して下さい。また、溶解後数回に分けて使う場合にはアシストチューブなどに分注し冷蔵保存して下さい。ただし、長期間保存すると高濃度域が測定できなくなることがあるため、2 週間以内に使用して下さい。

- このキットは 10~100 μmol/l の [NO₂⁻ + NO₃⁻] の測定に適しています。したがって、100 μmol/l 以上の高濃度のサンプル (3. 及び 4. の検量線の範囲を越えるサンプル) は希釈して測定して下さい。また、サンプル量が 80 μl 以下の場合には緩衝溶液で 80 μl にあわせて測定を行なって下さい。
- NO₂⁻ と NO₃⁻ の総量の濃度を測定する場合の検量線 (操作 4) は、酵素を用いるため感度が若干低下します。そのため、NO₂⁻ の濃度のみを測定する場合の検量線 (操作 3) とは一致しないのでご注意ください。
- 還元酵素及び補酵素は、使用前に混合して使用しないで下さい。必ず、別々の溶液として調製し、順次添加して下さい。
- 還元酵素及び補酵素は、凍結乾燥品のため、瓶内部が減圧になっています。溶媒を注入、溶解後開封して下さい。
- NO₂⁻ 及び NO₃⁻ 標準溶液は、開封後、1 ヶ月を越える保存には適しません。
- アルミの蓋を開けるときは怪我をしないよう気を付けること。

参考文献

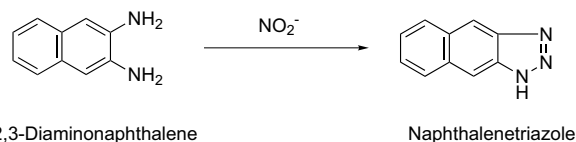
- S. Archer, "Measurement of Nitric Oxide in Biological Models", *FASEB J.*, **1993**, 7, 349.
- W. R. Tracy, J. Linden, M. J. Prach, and R. A. Johns, "Comparison of Spectrophotometric and Biological Assays for Nitric Oxide (NO) and Endothelium-Derived Relaxing Factor (EDRF): Nonspecificity of the Diazotization Reaction for NO Failure to Detect EDRF", *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1990**, 252, 922.
- J. S. Pollock, U. Forstermann, J. A. Mitchell, T. D. Warner, H. H. H. Schmidt, M. Nakane, and F. Murad, "Purification and Characterization of Particulate Endothelium-Derived Relaxing Factor Synthase from Cultured and Native Bovine Aortic Endothelial Cells", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1991**, 88, 10480.
- H. H. H. Schmidt, T. D. Warner, M. Nakane, U. Forstermann, F. Murad, "Regulation and Subcellular Location of Nitrogen Oxide Synthases in RAW264.7 Macrophages", *Mol. Pharmacol.*, **1992**, 41, 615.

II. 蛍光にて測定を行う場合

1. はじめに

2,3-Diaminonaphthalene は Griess 試薬と同様に NO₂⁻ と反応し、蛍光を発することから、より高感度に NO₂⁻ を定量することができる。この章では小社 NO₂/NO₃ Assay Kit - FX (Fluorometric)~2,3-Diaminonaphthalene Kit~(Code: NK08) を用いた方法について記載する。

このキットは、2,3-Diaminonaphthalene が酸性条件下で NO₂⁻ と反応しナフタレントリアゾールの蛍光性付加体を形成することを利用して検出する方法を用いている。この反応は pH2 以下で進行し、生成した付加体は pH10 以上で最も効率よく蛍光を発する。



発生した NO を測定するためには NO₂⁻ と同時に NO₃⁻ についても測定する必要があるため、酵素を用いて NO₃⁻ を NO₂⁻ に還元しなければならない。本キットは還元酵素を含んでいるので [NO₂⁻] と [NO₃⁻] の両方が測定できる。1~10 μmol/l の濃度範囲の測定に適している。

細胞
増殖/毒性
酸化
ストレス
分子
生物学
細胞内
蛍光プローブ
細胞
染色
ミトコンドリア
関連試薬
細菌研究用
試薬
膜タンパク質
可溶化剤
ラベル
化剤
二価性
試薬
イオン
電極
その他
機能性
有機材料

2. キット内容

- Buffer Solution × 1
- NaNO₂ Standard Solution (200 μmol/l) × 2
- NaNO₃ Standard Solution (200 μmol/l) × 2
- NO₃ Reductase × 2
- Enzyme Cofactors × 2
- Fluorescence Reagent (DAN) Solution × 1
- Stop Solution × 1

※ 希釈・溶解後の溶液は冷蔵保存の上、2週間以内に使用する。
 ※ NO₃⁻を多く含む培地 (RPMI1640 など) や フェノールレッドを含む培地は使用できない。

3. 溶液調製

- 1) NaNO₂ Standard Solution 1本に Buffer Solution (又は培地) 9 ml を加え、20 μmol/l の Standard Solution を調製する。
- 2) NaNO₃ Standard Solution 1本に Buffer Solution (又は培地) 9 ml を加え、20 μmol/l の Standard Solution を調製する。
- 3) NO₃ Reductase 1本に Buffer Solution 1.2 ml を加え、NO₃ Reductase Solution を調製する。
- 4) Enzyme Cofactors 1本に Buffer Solution 1.2 ml を加え、Enzyme Cofactors Solution を調製する。

※ NO₃ Reductase 及び Enzyme Cofactors は、凍結乾燥品のため瓶内部が減圧になっている。減圧のまま開封すると中身が飛散する恐れがあるので、必ず Buffer Solution をシリンジで注入し、溶解後開封すること。

4. [NO₂⁻] 検量線

- 1) 96 穴マイクロプレートの検量線作成用の各ウェルに Buffer Solution (又は培地) 80 μl を分注する。20 μmol/l NaNO₂ Standard Solution 80 μl をプレート上で系列希釈し、Standard を調製する(図 3 参照)。
- 2) 各ウェルに Buffer Solution 20 μl を加え、全量を 100 μl とする。
- 3) 各ウェルに Fluorescence Reagent (DAN) Solution 10 μl を加えよく混和する。
- 4) 室温にて 15 分間反応した後、各ウェルに Stop Solution 40 μl を加えよく混和する。
- 5) マイクロプレートリーダーで蛍光強度 (λ_{ex}= 360~365 nm, λ_{em}= 450~465 nm) を測定する。

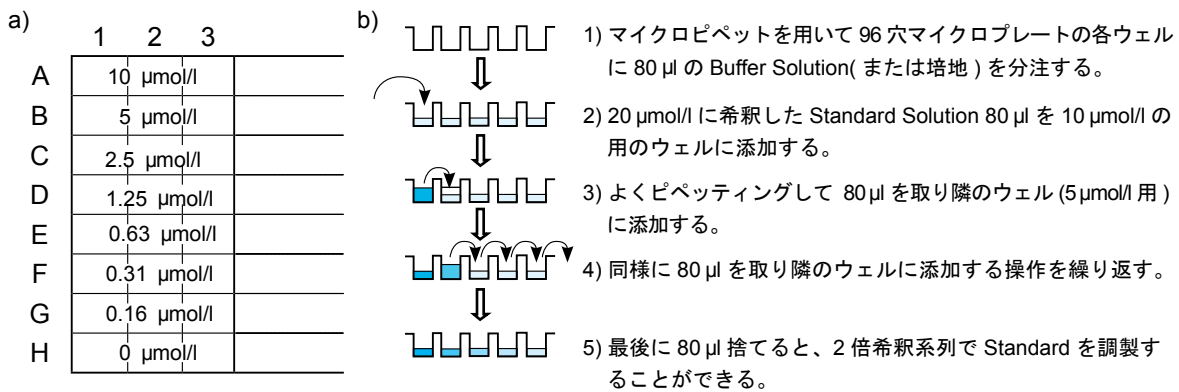


図 3 検量線作成方法の例
 a) 96 穴プレートでの検量線レイアウト例
 b) Standard Solution の希釈方法

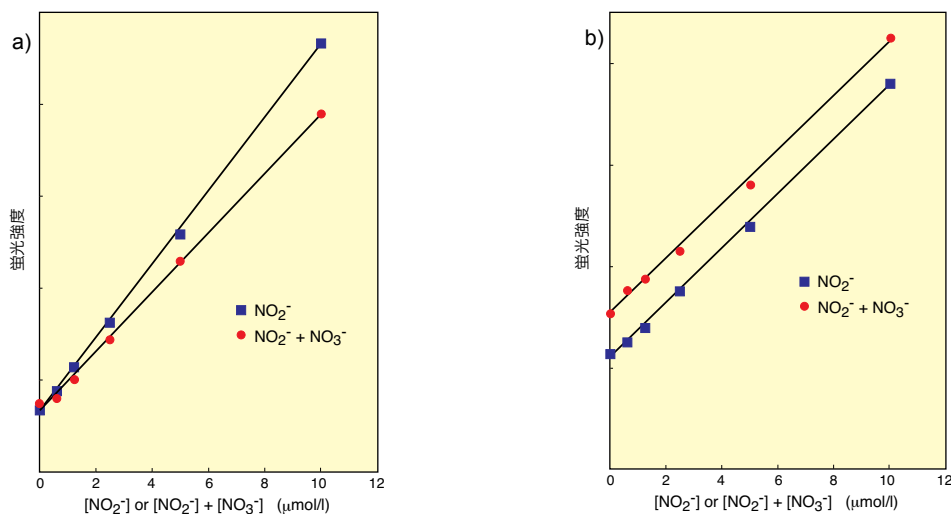


図 4 NO₂/NO₃ Assay Kit - FX を用いて測定した [NO₂⁻] と [NO₂⁻ + NO₃⁻] の検量線
 a) Buffer Solution 中、b) 培地 (DMEM) 中

5. [NO₂⁻ + NO₃⁻] 検量線

- 1) 96穴マイクロプレートの検量線作成用の各ウェルに Buffer Solution(又は培地) 80 µl を分注する。20 µmol/l NaNO₃ Standard Solution 80 µl をプレート上で系列希釈し、Standard を調製する(図3参照)。
- 2) 各ウェルに Enzyme Cofactors Solution 10 µl を加える。
- 3) 各ウェルに NO₃ Reductase Solution 10 µl を加え、よく混和する。
- 4) マイクロプレートに蓋をし、37°Cで30分間インキュベートする。
- 5) 室温まで放冷後、各ウェルに Fluorescence Reagent (DAN) Solution 10 µl を加えよく混和する。
- 6) 室温にて15分間反応した後、各ウェルに Stop Solution 40 µl を加えよく混和する。
- 7) マイクロプレートリーダーで蛍光強度 (λ_{ex}= 360~365 nm, λ_{em} = 450~465 nm) を測定する。

※ [NO₂⁻+NO₃⁻] 検量線は、酵素反応を利用して NO₃⁻を NO₂⁻に還元して測定する。本プロトコルでは NaNO₃ Standard Solution を用いているが、NaNO₂ Standard Solution を用いた場合も同じ検量線が得られる。

※ [NO₂⁻ + NO₃⁻] 検量線は、酵素等の影響により [NO₂⁻] 検量線とはかかわらずしも一致しない。

※ 蛍光光度計で測定する場合は Stop Solution 添加後の溶液を 100 µl 取り、純水で 4 ml に希釈し蛍光強度を測定すること。

6. サンプルの調製法

培養液あるいは血清などを試料として測定に用いる場合、以下の点に注意して調製すること。

- 1) MEM あるいは DMEM などの細胞培養液を測定に用いる場合、1,000 x g (15 min, RT) で遠心分離し、その上澄みを試料とする。フェノールレッドは測定を妨害するため、培地はフェノールレッド不含のものをご使用する。
- 2) 血清を測定に用いる場合、Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Unit with Ultracel-10 membrane (UFC801008), Millipore 社) などで除タンパクを行う。
- 3) 硝酸イオンを多く含む培養液 (RPMI1640 など) は [NO₂⁻ + NO₃⁻] の測定はできないが、[NO₂⁻] のみについては測定可能である。

7. 未知試料の [NO₂⁻] 測定

- 1) 96穴マイクロプレートに試料 80 µl を加える。
- 2) 各ウェルに Buffer Solution 20 µl を加え、全量を 100 µl とする。
- 3) 各ウェルに Fluorescence Reagent γ(DAN) Solution 10 µl を加えよく混和する。
- 4) 室温にて15分放置した後、各ウェルに Stop Solution 40 µl を加えよく混和する。
- 5) マイクロプレートリーダーで蛍光強度 (λ_{ex}=360~365 nm, λ_{em}=450~465 nm) を測定し、[NO₂⁻] の検量線から濃度を求める。

8. 未知試料の [NO₂⁻ + NO₃⁻] 測定

- 1) 96穴マイクロプレートに試料 80 µl を加える。
- 2) 各ウェルに Enzyme Cofactors Solution 10 µl を加える。
- 3) 各ウェルに NO₃ Reductase Solution 10 µl を加え、よく混和する。
- 4) マイクロプレートに蓋をし、37°Cで30分間インキュベートする。
- 5) 室温まで放冷後、各ウェルに Fluorescence Reagent (DAN) Solution 10 µl を加えよく混和する。
- 6) 室温にて15分間反応した後、各ウェルに Stop Solution 40 µl を加えよく混和する。
- 7) マイクロプレートリーダーで蛍光強度 (λ_{ex}=360~365 nm, λ_{em}= 450~465 nm) を測定し、[NO₂⁻+NO₃⁻] の検量線から濃度を求める。

9. 未知試料の [NO₃⁻] 測定

本 Kit では [NO₃⁻] のみの値は直接的には得られない。測定試料中の [NO₃⁻] は [NO₂⁻] と [NO₂⁻ + NO₃⁻] を用いて、下記の計算式により求めることができる。

$$[NO_3^-] = [NO_2^- + NO_3^-] - [NO_2^-]$$

※ 蛍光光度計で測定する場合は Stop Solution 添加後の溶液を 100 µl 取り、純水で 4 ml に希釈し蛍光強度を測定すること。

参考文献

- 1) T. P. Misco, R. J. Schilling, D. Salvemini, W. M. Moore, and M. G. Currie, "A Fluorometric Assay for the Measurement of Nitrite in Biological Samples", *Anal. Biochem.*, **1993**, 214, 11.
- 2) D. Salvemini, K. Seibert, J. L. Masferrer, T. P. Misko, M. G. Currie, and P. Needleman, "Endogenous Nitric Oxide Enhances Prostaglandin Production in a Model of Renal Inflammation", *J. Clin. Invest.*, **1994**, 93, 1940.
- 3) A. H. Cross, T. P. Misko, R. F. Lin, W. F. Hickey, J. L. Trotter, and R. G. Tilton, "Aminoguanidine, an Inhibitor of Inducible Nitric Oxide Synthase, Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in SJL Mice", *J. Clin. Invest.*, **1994**, 93, 2684.
- 4) R. G. Tilton, K. Chang, J. A. Corbett, T. P. Misko, M. G. Currie, N. S. Bora, H. J. Kaplan, and J. A. Williamson, "Endotoxin-Induced Uveitis Rat is Attenuated by Inhibition of Nitric Oxide Production", *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **1995**, 35, 3278.
- 5) P. Damiani and G. Burini, "Fluorometric Determination of Nitrite", *Talanta*, **1986**, 33, 649.